



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 196 06 207 A 1

⑯ Int. Cl. 6:  
**G 01 N 21/75**  
G 01 N 33/15  
C 12 Q 1/00  
G 01 N 33/483

⑯ Aktenzeichen: 196 06 207.1  
⑯ Anmeldetag: 21. 2. 96  
⑯ Offenlegungstag: 28. 8. 97

DE 196 06 207 A 1

⑯ Anmelder:  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225  
Düsseldorf, DE

⑯ Vertreter:  
Cohausz Hase Dawidowicz & Partner, 40237  
Düsseldorf

⑯ Erfinder:  
Neumann, Norbert J., Dr., 40229 Düsseldorf, DE;  
Hölzle, Erhard, Prof. Dr., 21077 Hamburg, DE;  
Rosenbruch, Martin, Dr., 40595 Düsseldorf, DE;  
Plewig, Gerd, Prof. Dr., 80337 München, DE;  
Lehmann, Percy, Prof. Dr., 40591 Düsseldorf, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE	44 04 977 C2
DE	43 08 520 A1
DE	39 39 411 A1
DE	38 02 780 A1
DE	30 38 255 A1
CH	6 28 736
GB	22 15 043 A
EP	04 97 399 A1
WO	94 02 847 A1
WO	85 05 184 A1

⑯ Verfahren zur Bestimmung der Phototoxizität und/oder Photosensibilität von Stoffen oder Stoffgemischen  
sowie dessen Verwendung

⑯ Offenbart wird ein Verfahren zur Bestimmung der Phototoxizität und/oder Photosensibilität von Stoffen oder Stoffgemischen, umfassend die Kontaktierung des chemischen Stoffes oder Stoffgemisches mit einem Wirbeltierembryo oder Geweben oder Gewebebestandteilen eines Wirbeltierembryos, wobei nach der Kontaktierung zusätzlich eine Behandlung mit einer elektromagnetischen Strahlung im Bereich von 1 mm bis 200 nm erfolgt sowie die nachfolgende Beurteilung der Embryo-, Gewebe- oder Zellpathologie sowie die Verwendung eines Wirbeltierembryos oder Geweben oder Gewebebestandteilen eines solchen Embryos zur Bestimmung der Phototoxizität und/oder Photosensibilität von chemischen Stoffen/Stoffgemischen.

DE 196 06 207 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Toxizität elektromagnetischer Strahlung, der Phototoxizität, und/oder Photosensibilität von Stoffen oder Stoffgemischen sowie dessen Verwendung.

Unter Phototoxizität im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man eine durch elektromagnetische Strahlung im Bereich von 1 mm bis 200 nm hervorgerufene Schädigung der Lokalverträglichkeit durch die Einwirkung von Infrarot-, sichtbaren und UV-Strahlung.

Insbesondere versteht man unter einer phototoxischen Reaktion eine durch die Bestrahlungsenergie und/oder sensibilisierende Substanzen, die exogen oder endogen in die Haut gelangen, zu einer Photodermatose führen. Hierbei absorbieren derartige phototoxische Substanzen nicht nur UV-Strahlung, sie können durch diese auch chemisch verändert werden. In Abhängigkeit von ihrer chemischen Struktur sind sie in verschiedenen Strahlungsbereichen absorptionsfähig. Es wird angenommen, daß zwischen der Menge an Strahlungsenergie und der von ihr getroffenen Substanz eine entsprechende Korrelation besteht. Wenig Energie und viel Substanz haben die gleiche Wirkung wie wenig Substanz und viel Strahlungsenergie. Bei einem maximalen Aufeinandertreffen beider Reaktionsparameter wird die phototoxische Reaktion besonders intensiv sein. Eine phototoxische Reaktion tritt in der Regel etwa 8 bis 12 Stunden nach der ersten Exposition auf. Mitunter kann dies auch früher der Fall sein. Übliche Symptome sind eine sehr starke Rötung verbunden mit Blasenbildung und einer später eintretenden postinflammatorischen Pigmentierung. Selbst ein Sonnenbrand kann als phototoxische Reaktion angesehen werden.

Unter einer photoallergischen Reaktion versteht man im Gegensatz zu einer phototoxischen Reaktion eine solche Reaktion die bereits auch bei leichterer Strahlung und wenig aktivierbarer Substanz auftritt. Diese ist auch nicht dosisabhängig. Der Mechanismus ist hier wie bei der Allergie, wobei die durch die Strahlung veränderte Fremdstoff zum Hapten werden kann, das sich mit dem Protein zu einem Allergen ausbildet. Die Erscheinung einer photoallergischen Reaktion manifestiert sich meist ekzematös. Sie tritt 48 bis 72 Stunden ab Beginn der Sonnenexposition auf. Entsprechend dem Entstehungsmechanismus einer Allergie tritt sie nie nach der ersten Exposition auf, da ja diese erst zur Bildung von Antikörpern führt. Photoallergische Reaktionen sind nicht auf die von der Strahlung exponierten Hautteile beschränkt. Sie treten im Sinne eines Streuphänomens auch an anderen, nicht bestrahlten Körperteilen auf. Das Aktionspektrum ist gegenüber dem Absorptionsspektrum eher in den langwelligeren Bereich verschoben. Besonders problematisch sind photoallergische Allergien als Reaktion auf chemisch verwandte Substanzen, wie beispielsweise Parastoffe. Die am Phenylring in Parastellung substituierte Amino-, Hydroxy- und Nitrogruppe ist das strukturtechnische Merkmal.

Es ist bereits bekannt, daß Hühnerembryos eingesetzt werden, um die toxikologischen Eigenschaften von Prüfsubstanzen zu untersuchen. Zumeist werden die Substanzproben zu diesem Zwecke über das extraembryonale Blutgefäßsystem dem Embryo zugeführt.

Zwei wissenschaftliche Veröffentlichungen aus der jüngsten Literatur seien stellvertretend für die geläufige Anwendung des Hühnerembryos als Modellsystem pharmakologischer (Roberts, W.G. und Hasan, T. CANCER RESEARCH, Band 52, 924 bis 930, 1992) oder toxikologischer Testreihen (Goldberg, S.J., Dawson, B.V., Johnson, P.D., Hoyme, H.E. und Ulreich, J.B., PEDIATRIC RESEARCH, Band 32, 23 bis 26, 1992) genannt.

In der Veröffentlichung von Roberts und Hasan werden die pharmakologischen/pharmakotopologischen Eigenschaften photodynamischer Agentien in proliferierenden vaskulären bzw. nonvaskulären Geweben des Hühnerembryos beschrieben. Die Hühnerembryogenese dient als Modellsystem für die Angiogenese in soliden Tumoren.

Die Veröffentlichung von Goldberg und Mitarbeitern beschreibt dagegen den Einsatz des Hühnerembryos als Methode, die Teratogenität von Substanzen, insbesondere von Dichlorethylen, zu überprüfen. Durch die vorgenannten Veröffentlichungen wird allerdings weder vorbeschrieben noch nahegelegt, phototoxische und/oder photosensitive Substanzen am Hühnerembryo zu untersuchen.

Für die Untersuchung von potentiell phototoxischen bzw. photosensitiven Substanzen stehen bisher nur ein Tiermodell oder Zellsysteme zur Verfügung.

Beim Tiermodell handelt es sich um den "Draize-Test", der die Reizreaktion der phototoxischen Substanzen am Kaninchenauge erfaßt. Seine Anwendung wird nicht nur unter Kostengesichtspunkten, sondern insbesondere auch unter dem Gesichtspunkt des Tierschutzes begrenzt.

Die vorhandenen Zellsysteme, d. h. Bakterien-, Hefe- und andere Eukaryontenzellen, sind gleichfalls als Modelle für Phototoxizität unbefriedigend, weil sie die physiologischen Rahmenbedingungen des phototoxischen bzw. photosensitiven Substanzverhaltens nur unzureichend nachstellen können.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein technisch einfach gestaltetes Verfahren für den Test von potentiell phototoxischen Substanzen zu schaffen, das einerseits die physiologischen Gegebenheiten an der Haut berücksichtigt und andererseits auch zukünftigen gesetzgeberischen Vorhaben und ethischen Anforderungen genügt. Diese Aufgabe wird durch die Merkmale von Anspruch 1 gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit einerseits ein Verfahren zur Bestimmung der Phototoxizität und/oder Photosensibilität von Stoffen oder Stoffgemischen, umfassend die Kontaktierung des chemischen Stoffes oder Stoffgemisches mit dem Wirbeltierembryo oder Gewebe- oder Gewebebestandteilen eines Wirbeltierembryos, wobei nach der Kontaktierung zusätzlich eine Behandlung mit UV-Strahlung erfolgt, sowie die nachfolgende Beurteilung der Embryo-, Gewebe- oder Zellpathologie.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform des vorliegenden Verfahrens werden vor der Kontaktierung Eier der Klasse Aves, d. h. Vögel, inkubiert, die dann, zu einem späteren Zeitpunkt nach der embryonalen Gastrulation, einen Teil des Eiweißes über wenigstens eine Öffnung aus dem Ei entfernt werden und gegebenenfalls eine weitere Inkubation erfolgt und eine weitere Öffnung aus dem oberen Bereich der Eischale für die Bestrahlung vorgesehen ist.

Obgleich grundsätzlich ein beliebiges Wirbeltierembryo oder ein Gewebe oder ein Gewebebestandteil eines Wirbeltierembryos eingesetzt werden kann, hat es sich aus praktischen Gründen als sinnvoll erwiesen, vorzugsweise inkubierte Eier der Klasse Aves, also Vögel, einzusetzen. Beispielhaft seien hier genannt die entsprechenden Eier von Straußen, Nandus, Emus, Kiwis, Steißhühnern, Hühnervögeln, Hoazinen, Kampfwachteln, Tauben, Flughühnern, Rallen, Blatthühnchen, Kranichen, Trappen, Möwen, Wattvögel, Alken, Seetauchern, Lappentauichern, Pinguinen, Sturmvögeln, entenartigen Gänsevögeln, Ruderfüßlern, Schreitvögeln, Flamingos, Tagraubvögeln, Kuckucken, Turakus, Papageien, Racker, Eisvögeln, Bienenfressern, Widehopfen, Naßhornvögeln, Eulen, Ziegenmelkern, Seglern, Kolibries, Mausvögeln, Trogons, Pfefferfressern, Bartvögeln, Honiganzeigern, Spechten und Sperlingsvögeln. Besonders bevorzugt ist es, als inkubierte Vogeleeier Eier der Gattung Galliformes, d. h. Hühnervögel, einzusetzen, worunter insbesondere Eier der Spezies Gallus bzw. auch Truthähne oder Puter fallen.

Die Dauer der Inkubation hängt üblicherweise von der Entwicklungszeit des jeweiligen Embryos ab.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird nach der ersten Inkubierung der Eier das Ei auch mit wenigstens einer Öffnung versehen. Diese Öffnung ist vorzugsweise so ausgestaltet, daß sie wenigstens eine Größe aufweist, daß durch die Öffnung ein Teil des Eiweißes entfernt werden kann. Dies geschieht vorzugsweise in der Art, daß mittels einer Absaugvorrichtung, vorzugsweise einer Pipette, wie beispielsweise einer Eppendorf-Pipette, ein Teil des Eiweißes, vorzugsweise 5 bis 10 ml des vorhandenen Eiweißes, entfernt wird.

Im Anschluß an die Absaugung erfolgt eine weitere Öffnung im oberen Bereich der Eierschale, um später eine Bestrahlung durchführen zu können. Dies geschieht im allgemeinen in der Weise, daß mit Hilfe einer mechanischen Vorrichtung eine weitere nun größere Öffnung in die Eierschale eingefügt wird, was beispielsweise durch eine scharfe Schneide- oder Fräsvorrichtung geschehen kann. Im Anschluß an die Anbringung der weiteren Öffnung im oberen Bereich der Eischale wird diese Öffnung wieder verschlossen und das Ei zurück in den Inkubator gegeben. Für das Verschließen der Öffnung verwendet man ein übliches Verschlußmittel, wobei es bevorzugt ist, beispielsweise eine Folie aus einem metallenthaltenden oder aus einem organischen Materialien enthaltenden Material zu verwenden. Beispielhaft seien hier Folien aus Kunststoff, Aluminium oder Verbundfolien genannt, ebenso wie entsprechende Wachspropfen. Daraufhin wird gegebenenfalls wiederum eine Inkubation durchgeführt.

Im Anschluß an diese Inkubation werden vorzugsweise am vierten Tag der Bebrütung die zu testenden Substanzen aufgebracht, wobei es sich bei diesen chemischen Stoffen/Stoffgemischen um biologisch aktive Substanzen, beispielsweise Kosmetika, Pharmazeutika, Herbizide oder Insektizide, handeln kann. Weiterhin kann es sich bei diesen chemischen Stoffen/Stoffgemischen auch um Lichtschutzstoffe für technische Erzeugnisse sowie für kosmetische und pharmazeutische Zusammensetzungen handeln, welche auch unter dem Namen UV-Filter bekannt sind.

Die Behandlung des mit dem chemischen Stoffe oder Stoffgemisch behandelten Embryo oder Geweben oder Gewebsbestandteilen dieses Embryos erfolgt üblicherweise mit einer elektromagnetischen Bestrahlung im Bereich von 1 mm bis 200 nm, worunter man normalerweise den Bereich der Infrarotstrahlung, der Strahlung des sichtbaren Lichtes und der UV-Strahlung versteht.

Bevorzugt ist es allerdings, daß die Behandlung mit einer UV-Strahlung einer Wellenlänge kleiner als 400 nm erfolgt, insbesondere mit Wellenlängen zwischen 250 und 400 nm, d. h. meistens mit einer UV-A-Strahlung einer Wellenlänge zwischen 315 und 400 nm, alternativ einer UV-B-Strahlung einer Wellenlänge von 280 bis 315 nm.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt die vorbeschriebene Behandlung mit der elektromagnetischen Strahlung im Infrarotbereich in an sich bekannter Art mit Infrarotstrahlern, ebenso wie man im sichtbaren Bereich entsprechende Wellenlängen über Farbfilter oder ein Prisma einstellen kann. Für den Bereich der UV-Strahlung existieren zahlreiche Strahlungsquellen, wie beispielsweise Quecksilberdampfstrahler, Xenon-Hochdruckstrahler, Natriumdampflampen, Wasserstoff- bzw. Deuteriumlampen sowie Niederdruckentladungsrohre mit Edelgasfüllungen. Darüber hinaus werden als UV-Strahler auch Wolframlampen bzw. Halogenlampen eingesetzt ebenso wie entsprechende Laser.

Sofern UV-Strahler eingesetzt werden, wird üblicherweise eine Bestrahlungsstärke von 1 mJ/cm<sup>2</sup> bis 100 J/cm<sup>2</sup> eingesetzt. Der obere Wert entspricht der maximalen UV-B-Dosis, der untere Wert der minimalen UV-A-Dosis. Bevorzugt ist der Einsatz von 5 bis 10 J/cm<sup>2</sup> UVA, insbesondere 5 J/cm<sup>2</sup>.

Die erfindungsgemäße Kontaktierung des chemischen Stoffes mit den Geweben oder Gewebebestandteilen, vorzugsweise der chorionallantoischen Membran, insbesondere der Dottersackgefäßmembran, des Embryos erfolgt entweder sofort oder diese Kontaktierung kann auch bis zu 24 Stunden betragen.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Beurteilung der makro- und/oder mikroskopischen Embryonalpathologie wiederum entweder sofort oder innerhalb eines Zeitraums bis zu 24 Stunden, vorzugsweise aber nach 5 min bis zu 24 Stunden. Im Rahmen der vorgenannten Beurteilung der makro- und/oder mikroskopischen Embryonalpathologie wird entweder der Tod des Embryos, die Hämorrhagie, die Membranverfärbung oder die Gewebe- bzw. Zellpathologie überprüft. Der vorliegenden Erfindung liegt weiterhin die Aufgabe zugrunde, ein Wirbeltierembryo, ein Gewebe oder ein Gewebebestandteil eines solchen Embryos zur Bestimmung der Phototoxizität und/oder Photosensibilität von chemischen Stoffen/Photogemischen einzusetzen.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert. Hierbei beziehen sich %-Angaben jeweils auf Gew.-%.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wurden zwei Verbindungen mit wohlbekannten phototoxischen Eigenschaften eingesetzt, das 8-Methoxypsoralen und das Hematoporphyrin. Das Promethazin und das Ciprofloxazin wurden eingesetzt um die phototoxischen Eigenschaften mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens zu beurteilen.

Hierzu mußte zunächst eine nicht-toxische Konzentration der vorgenannten Substanzen und eine nicht-toxi-

sche Dosis UVA-Strahlung experimentell definiert werden. Insofern wird das erfindungsgemäße Verfahren ähnlich durchgeführt wie der Hühnereitest selbst und dient zur Bestimmung der nicht-toxischen Wirkdosis einer Testsubstanz. In einem Vorversuch wurde herausgefunden, daß eine UVA-Strahlung von  $5 \text{ J/cm}^2$  keine makroskopischen pathologischen Effekte auf den Eidottersack ausübt. Beim erfindungsgemäßen Verfahren wurde eine 5 10fach leichtere Konzentration eingesetzt, um eine nicht-toxische Wirkdosis der Testsubstanz an dem Eierdottersack anzuwenden und toxische Reaktionen sicher auszuschließen. Nur in einem Fall, d. h. in Gegenwart von Ciprofloxazin, wurde eine nicht-toxische Konzentration eingesetzt, die klinisch für intravenöse Injektionen eingesetzt wurde.

Die zweite Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine Bewertung im Sinne eines  $2 \times 2$  faktoriellen Test 10 Designs mit den Faktoren "Bestrahlung" und "Substanz Applikation" und den Stufen "ja" und "nein", wie aus der nachstehenden Übersicht ersichtlich.

Substanz Applikation (nicht toxische Konzentration)

15	Be- strah- lung	ja	nein
20	ja	$n_1-12$	$n_2-12$
	nein	$n_3-12$	$n_4-12$

25 Innerhalb einer Dauer von 24 Stunden wurden folgende Parameter ausgewertet. Der Tod des Embryos, die halbquantitative Membranverfärbung und die Hämorrhagie. Dies wurde wie folgt durchgeführt. Befruchtete weiße Langhorneier (der Sorte Shaver Starcross 288A, Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, Deutschland) wurden in einer horizontalen Position in einem üblichen Inkubator bei  $37,5^\circ\text{C}$  und 65% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach einer 3-tägigen Inkubation wurden alle Eier durchleuchtet, um solche auszuordnen, die defekt waren. Ohne die Membranschale zu verletzen, wurde ein Loch in die Schale gebohrt, durch die 5 ml Eiweiß 30 abgezogen wurden, um das Embryo und den ihn umhüllenden Eidottersack zu erniedrigen. Daraufhin wurde ein  $1,5 \times 2,5 \text{ cm}$  großes Fenster aus der Eischale herausgesägt. Die Eier wurden mit einem entsprechend groß gesformten Wachsstück bedeckt und zurück in den Inkubator gegeben. An Tag 4 der Inkubation wurden nur 35 solche Eier mit normal entwickelten Embryos und Blutgefäßsystemen zum Test eingesetzt.

Die folgenden Testsubstanzen wurden appliziert: 8-Methoxypsoralen (8-MOP)  $10^{-3}$  molar in physiologischer 40 Kochsalzlösung, Hematoporphyrin  $10^{-5}$  molar ebenfalls in physiologischer Kochsalzlösung (0,9%-ige Natriumchloridlösung), Promethazin  $10^{-3}$  molar in physiologischer Kochsalzlösung und Ciprofloxazin  $6,035 \times 10^{-3}$  molar in physiologischer Kochsalzlösung. Für jede Testsubstanz wurde das  $2 \times 2$  faktorielle Test Design verwendet. Jedesmal wurde zu einer Probe von 12 Eiern  $500 \mu\text{l}$  der Testsubstanz mittels einer Eppendorf-Pipette 45 appliziert und daraufhin mit einem  $5 \text{ J/cm}^2$  UVA-Strahler (320–420 nm, Philips TL 09/40W, Hamburg, Deutschland) bestrahlt. Jeweils 12 Eier dienten als Vergleich ohne Substanz, denen  $500 \mu\text{l}$  physiologische Kochsalzlösung bzw.  $500 \mu\text{l}$  physiologische Kochsalzlösung in Verbindung mit einer  $5 \text{ J/cm}^2$  UVA-Bestrahlung ausgesetzt wurden. Eine Bewertung erfolgte unmittelbar danach sowie 5,15, 30 und 45 min bzw. 1, 2, 4, 6, 8, 10 und bis zu 24 Stunden nach der Bestrahlung. Während dieser Zeit wurde der Tod der Embryos und halbquantitativ anhand einer 4-Punkt-Skala die Membranverfärbung und die Hämorrhagie bestimmt.

45 Hierbei wurde folgende Klassifikation eingesetzt:

Stufe 0: keine sichtbare Membranverfärbung/Hämorrhagie

Stufe 1 (leicht): gerade sichtbare Membranverfärbung/Hämorrhagie

Stufe 2 (mittel): sichtbare Membranverfärbung/Hämorrhagie, Strukturen sind teilweise verschwommen

Stufe 3 (schwer): sichtbare Membranverfärbungen/Hämorrhagie, Strukturen sind völlig verschwommen.

50 Die vorgenannten Veränderungen wurden mittels eines Makroskops Typ M 420 der Firma Leitz Meßtechnik GmbH, Wetzlar, Deutschland aufgezeichnet. Um die Folgen statistisch analysieren zu können, wurden nicht parametrische Tests eingesetzt. Für die Membranverfärbungsparameter und die Hämorrhagie wurde der Kontingenztafeltest für spezielle Klassen (eine Version des Kruskal-Wallis Testes, modifiziert für geordnete Kategorien) eingesetzt. Die Todesraten wurden mittels des Fisher Kontingenztafeltests analysiert. Folglich wurden für jede Verbindung drei statistische Tests berechnet. Unter Berücksichtigung der Anzahl der Tests und um die vermehrte Wahrscheinlichkeit, ein signifikantes Ergebnis zu finden, zu kompensieren, wurde der  $\alpha$ -Level angepasst ( $\alpha''$ ). Folglich wurde jeder der drei Einzeltests bei einem Signifikanzwert von  $\alpha'' = 0,0513$ , d. h. 0,0167, durchgeführt.

60 **ERGEBNISSE**

Hematoporphyrin

65 Bei Hematoporphyrin (H P) wurden beträchtliche morphologische Änderungen mit einem Maximum nach 12 Stunden beobachtet. Nach 24 Stunden zeigten 75,0% ( $n = 9$ ) der Eidottersäcke eine schwere Verfärbung der Membran, 16,7% ( $n = 2$ ) eine mittlere und 8,3% ( $n = 1$ ) eine leichte Verfärbung der Membran bei Substanzen, die sowohl mit HP wie auch UVA-Strahlung

behandelt worden waren. Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollmessungen nur leichte oder mittlere Membranverfärbungen (bei alleinigem Einsatz von HP)

33,3% (n=4) leichte und

25,0% (n=3) mittlere Membranverfärbungen; bei der Kontrollgruppe, die nur mit physiologischer Kochsalzlösung und UV-A behandelt worden ist

5

50,0% (n=6) leichte Membranverfärbungen und

25,0% (n=3) mittlere Membranverfärbungen; und schließlich bei der nur mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Vergleichsgruppe waren

50,0% (n=6) leicht und

16,7% (n=2) der Membranen mäßig verfärbt). Der Kontingenztafeltest für geordnete Klassen zeigte ein 10 signifikantes Ergebnis ( $p < 0,00004$ ).

Nach 24 Stunden zeigten

50,0% (n=6) der Eidottersäcke (Dottersackgefäßmembranen) eine mittlere und

50,0% (n=6) eine leichte Hämorrhagie, bei der sowohl mit HP wie auch UV-A behandelten Gruppe. Im Gegensatz dazu zeigten die Vergleichsproben nur eine leichte Hämorrhagie (HP selbst

15

33,3% (n=4) einer leichten Hämorrhagie, bei physiologischer Kochsalzlösung und UV-Bestrahlung

25,0% (n=3) einer leichten Hämorrhagie; und bei physiologischer Kochsalzlösung allein

16,7% (n=2) einer leichten Hämorrhagie). Der Kontingenztafeltest für geordnete Klassen zeigte ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,00001$ ).

Weiter wurde gefunden, daß in

41,7% (n=5) der HP/UVA-Gruppe es zu einem Tod der Embryos kam. Im Gegensatz dazu wurde bei keiner der Vergleichsproben ein Tod der Embryos festgestellt. Fisher's Kontingenztafeltest zeigte ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,0094$ ).

20

#### 8-Methoxypsonalen

25

Die wesentlichen morphologischen Veränderungen wurden nach einem Maximum von 12 Stunden beobachtet. Nach 24 Stunden zeigten

16,7% (n=2) der Eidottersäcke schwere,

30

75,0% (n=9) mittlere und

8,3% (n=1) leichte Membranverfärbungen in der 8-MOP/UVA-Gruppe.

Die Vergleichsproben zeigten nur leichte bis mittlere Membranverfärbungen (MOP selbst

58,3% (n=7) leichte und

33,3% (n=4) mittlere Membranverfärbungen; bei der Gruppe, mit physiologischer Kochsalzlösung und UVA wurden bei

35

50,0% (n=6) leicht verfärbte Membranen gefunden, bei der nur mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Vergleichsprobe fand man

41,7% (n=5) leichte Membranverfärbung und

16,7% (n=2) mittlere Membranverfärbung). Der Kontingenztafeltest für geordnete Klassen zeigte ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,00002$ ).

40

Nach 24 Stunden fand man bei

91,7% (n=11) der Eidottersäcke eine schwere und

8,3% (n=1) einer mittleren Hämorrhagie bei der 8-MOP/UVA-Gruppe. Die Vergleichsproben zeigten eine nur leichte Hämorrhagie (8-MOP selbst

16,7% (n=2) leichte Hämorrhagie; bei der Gruppe, die mit physiologischer Kochsalzlösung und UVA behandelt worden ist

45

8,3% (n=1) leichte Hämorrhagie; bei der nur mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Gruppe

8,3% (n=1) leichte Hämorrhagie). Der Kontingenztafeltest für geordnete Klassen zeigte ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,00000$ ).

Für die 8-MOP/UVA-Gruppe wurde eine Letalität der Embryos von 100% (n=12) festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde bei den Vergleichsproben nie ein Tod der Embryos festgestellt. Fisher's Kontingenztafeltest zeigte ein signifikantes Resultat ( $p < 0,00000$ ).

50

#### Promethazin

55

Eine bedeutende Schädigung der Dottersackgefäßmembran mit einer Spalte 12 Stunden nach der Bestrahlung wurde nur in Bezug auf Promethazin (PMZ) in Kombination mit UVA-Strahlung festgestellt. Nach 24 Stunden zeigten

66,7% (n=8) der Eidottersäcke eine schwere,

60

8,3% (n=1) eine mittlere und

25,0% (n=3) eine leichte Membranverfärbung in der PMZ/UVA-Gruppe.

Die Kontrollproben zeigten nur eine leichte oder mittlere Membranverfärbung (PMZ selbst

50,0% (n=6) leichte Membranverfärbung; die mit physiologischer Kochsalzlösung und UVA behandelte Gruppe

65

58,3% (n=7) leichte Membranverfärbungen; und die ausschließlich mit physiologischer Kochsalzlösung behandelte Gruppe zeigte

58,3% (n=7) leichte Membranverfärbungen und

8,3% (n=1) mittlere Membranverfärbungen). Der Kontingenztafeltest für geordnete Klassen zeigte ein signifi-

kantes Ergebnis ( $p < 0,00005$ ).

Nach 24 Stunden fand man bei

41,7% (n = 5) der Dottersackgefäßmembran eine schwere, bei

41,7% (n = 5) eine mittlere und bei

5 8,3% (n = 1) eine leichte Hämorrhagie, in der PMZ/UBA-Gruppe. Die Kontrollversuche zeigten nur eine leichte Hämorrhagie (PMZ selbst

8,3% (n = 1) leichte Hämorrhagie; bei Einsatz einer physiologischen Kochsalzlösung und einer UVA-Bestrahlung

8,3% (n = 1) einer leichten Hämorrhagie; und bei physiologischer Kochsalzlösung selbst bei

10 8,3% (n = 1) einer leichten Hämorrhagie). Der Kontingenztafeltest für geordnete Kategorien zeigte ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,00000$ ).

Nach 24 Stunden waren

100% der Embryos in der PMZ/UVA-Gruppe gestorben. Nur zwei tote Embryos fand man in den Vergleichsgruppen (nämlich bei der Gruppe mit physiologischer Kochsalzlösung und UVA

15 8,3% (n = 1) sowie bei physiologischer Kochsalzlösung selbst

8,3% (n = 1). Fisher's Kontingenztafeltest zeigte ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,00000$ ).

#### Ciprofloxazin

20 Eine bedeutende Schädigung der Dottersackgefäßmembran wurde nur bei einer Kombination von Ciprofloxazin (CF) mit UVA gefunden. Nach 24 Stunden waren

91,7% (n = 11) der Dottersackgefäßmembranen schwer und

8,3% (n = 1) der Membranen mäßig in der CF/UVA-Gruppe verfärbt. Dem gegenüber zeigten die Vergleichsproben leichte und mittlere Membranverfärbungen (CF selbst

25 75,0% (n = 9) leichte Membranverfärbungen und

25,0% (n = 3) mittlere Membranverfärbungen; bei der Gruppe, die mit physiologischer Kochsalzlösung und UVA behandelt wurde; fand man

66,7% (n = 8) leichte Membranverfärbung und

8,3% (n = 1) mittlere Membranverfärbung. Bei der ausschließlich mit physiologischer Kochsalzlösung fand man

30 58,3% (n = 7) leichte Membranverfärbungen und

8,3% (n = 1) mittlere Membranverfärbungen). Der Kontingenztafeltest für geordnete Klassen zeigte ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,00000$ ).

Nach 24 Stunden zeigten

50,0% (n = 6) der Dottersackgefäßmembranen eine leichte Hämorrhagie und

35 16,7% (n = 2) eine mittlere Hämorrhagie in der CF/UVA-Gruppe. Die Vergleichsproben zeigten nur eine leichte Hämorrhagie (CF selbst

41,7% (n = 5) leichte Hämorrhagie. In der mit physiologischer Kochsalzlösung und UVA behandelten Gruppe fand man

25,0% (n = 3) leichte Hämorrhagie und in der ausschließlich mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Gruppe

40 40,0% leichte Hämorrhagie

33,3% (n = 4) leichte Hämorrhagie). Diese Gruppen unterschieden sich nicht deutlich untereinander. Keines der Embryos starb in irgendeiner der Gruppen.

#### Patentansprüche

45 1. Verfahren zur Bestimmung der Phototoxizität, und/oder Photosensibilität von Stoffen oder Stoffgemischen, umfassend die Kontaktierung des chemischen Stoffes oder Stoffgemisches mit einem Wirbeltierembryo oder Gewebe oder Gewebebestandteilen eines Wirbeltierembryos, wobei nach der Kontaktierung zusätzlich eine Behandlung mit einer elektromagnetischen Strahlung im Bereich von 1 nm bis 200 nm erfolgt sowie die nachfolgende Beurteilung der Embryo-, Gewebe- oder Zellpathologie.

50 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Kontaktierung Eier der Klasse Aves inkubiert werden, zu einem späteren Zeitpunkt nach der embryonalen Gastrulation ein Teil des Eiweißes über wenigstens eine Öffnung aus dem Ei entfernt wird, gegebenenfalls eine weitere Inkubation erfolgt und schließlich eine weitere Öffnung aus dem oberen Bereich der Eischale für die Belichtung vorgesehen wird.

55 3. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die chemischen Stoffe/Stoffgemische biologisch aktive Substanzen, insbesondere Pharmazeutika, Herbizide oder Insektizide umfassen oder Lichtschutzstoffe für technische oder biologisch aktive Substanzen sind.

60 4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung mit einer UV-Strahlung einer Wellenlänge < 400 nm, vorzugsweise im Bereich zwischen 400 nm und 250 nm erfolgt.

5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die UV-Strahlung mit einer Bestrahlungsstärke von 1 mJ/cm<sup>2</sup> bis 100 J/cm<sup>2</sup>, vorzugsweise 1 bis 20 J/cm<sup>2</sup> UVA, insbesondere 5 bis 10 J/cm<sup>2</sup> UVA erfolgt.

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Kontaktierung des Stoffgemisches für eine Zeit von 10 sec bis 24 Stunden mit Gewebe oder Gewebebestandteilen, vorzugsweise der Dottersackgefäßmembran oder der chorionallantoischen Membran des Embryos erfolgt.

7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Beurteilung der makro- und/oder mikroskopischen Embryonalpathologie innerhalb einer Zeit von bis zu 24 Stunden, vor-

zugsweise zwischen 5 min bis 12 Stunden erfolgt.  
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Tod des Embryos, Hämorrhagie, Membranverfärbung oder die Gewebe- bzw. die Zellpathologie beurteilt werden.  
9. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß Eier der Gattung Galliformes insbesondere aber Eier der Gattung Gallus oder Truthahn eingesetzt werden.  
10. Verwendung eines Wirbeltierembryos oder Geweben oder Gewebebestandteilen eines solchen Embryos zur Bestimmung der Phototoxizität, und/oder Photosensibilität von chemischen Stoffen/Stoffgemischen.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**- Leerseite -**



**Linguistic Systems, Inc.**  
201 Broadway, Cambridge, MA 02139 | Phone: 617-528-7400 | Fax: 617-528-7490  
Email: [info@linguist.com](mailto:info@linguist.com) | [www.linguist.com](http://www.linguist.com)

October 25, 2005

Joanne Scala  
Morrison & Foerster LLP  
755 Page Mill Road  
Palo Alto, California 94034

Reference: German Patent No. DE 196 06 207 A 1

Dear Joanne,

This is to confirm that Linguistic Systems, Inc. provided a Machine Translation of the above referenced material to you on or about October 21, 2005. The Machine Translation was without post editing.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink that appears to read "Bruce MacDonald".

Bruce MacDonald  
Director of the Legal Translation Center  
Linguistic Systems, Inc.  
[www.linguist.com](http://www.linguist.com)

617-528-7436 Voice

[bmacdonald@linguist.com](mailto:bmacdonald@linguist.com)

C 12 Q 1/00  
G 01 N 33/483

⑧ file references: 19606 207.1  
⑧ announcing day: 21. 96  
⑧ disclosure day: 28. 97

8.

N  
Cfl  
O  
O  
O)  
e  
W

---

**71 applicants:**  
Heinrich Heine university Duesseldorf, 40225 Duesseldorf, DE

**74 representatives:**  
Cohausz hare Dawidowicz & partner, 40237 Duesseldorf

® inventors:

Neumann, Norbert J., Dr., 40229 Duesseldorf, DE; Hoelzle, Erhard, Professor Dr., 21077  
Hamburg, DE; Rose break, Martin, Dr., 40595 Duesseldorf, DE; Polarizing TIG, Gerd,  
Professor Dr., 80337 Munich, DE; Lehmann, Percy, Professor Dr., 40591 Duesseldorf, DE  
® for the evaluation of the patentability block letters which can be considered:

DF 4404977 C2  
DE 43 08 520  
DE 3939411  
DE 38 02 780  
DE 30 38 255  
CH 6 28 736  
GB 221504A  
EP 04 97 399  
WHERE 9402847A1  
WHERE 85 05 184  
aluminium

® procedures for the determination of the photo toxicity and/or photo sensitivity of materials or material mixtures as well as its use

**O**A procedure for the regulation the photo toxicity and/or photo sensitivity of materials or material mixtures, comprehensively the contacting of the chemical material or material mixture with a vertebrate animal embryo or fabrics or fabric components of a Wirbeltie rembryos, is revealed whereby after contacting additionally a treatment with an electromagnetic radiation in As well as range from 1 mm to 200 Nm takes place the following evaluation of the embryos -, fabric or tent pathology as well as the use of a vertebrate animal embryo or a Gewe ben or fabric components of such an embryo for the determination of the photo toxicity and/or photo sensitivity of chemical material/material mixtures.

---

196 06 207 A 1

---

Description

The invention concerns a procedure for the determination of the toxicity of electromagnetic radiation of the photo toxicity, and/or photo sensitivity of materials or material mixtures as well as its use.

5 under photo toxicity in the sense of the available invention one understands one by electromagnetic radiation within the range of 1 mm to 200 Nm caused damage of the restaurant compatibility by the effect of infrared -, more visibly and UV radiation.

In particular one understands one by a photo-toxic reaction by the irradiation energy and/or sensitizing substances, which arrive exogenously or endogenously into the skin, to a Photodermatose leads

tons here do not only absorb such photo-toxic substances UV radiation it can by these be also chemically changed. As a function of your chemical structure they are in different Strah.,, lungsbereichen absorbently. It is accepted the fact that between the quantity of radiation energy and the correlation appropriate of outer met substance exists little energy and has much substance the same effect as little substance and much radiation energy. During maximum meeting one another of both reaction parameters the photo-toxic reaction will be particularly intensive. A photo-toxic reaction arises to usually about 8 to 12 hours after the first exposition. Every now and then this can be also in former times the case. Usual symptoms are connected a very strong turning red with blistering and postinflammatorischen pigmentation occurring later. Even a sun fire can be regarded as photo-toxic reaction.

20 under a photoallergischen reaction one does not understand contrary to a photo-toxic reaction such a reaction already even with easier radiation and little activatable substance arises these is dose-dependent also. The mechanism is usually ekzematoes as with the allergy, whereby the foreign substance changed by the radiation can become the Hapten, with the protein to an all gene is formed the feature of a photoallergischen reaction here manifests itself. She retires 48 to 72 hours

25 beginning of the sun exposition up. According to the developing mechanism of an allergy it arises after the first exposition, there these only for the formation of anti-bodies never leads Photoallergi reactions is not on the skin parts exposed by the radiation does not limit you arises in the sense of a strewing phenomenon also at others, to not illuminated parts of the body. The action spectrum is rather into the boring range shifted in relation to the absorption spectrum. Photoallergische allergies are particularly problematic as

so reaction to chemically used substances, as for example Parastoffe. The Amino substituted at the Phenylring in Parastellung -, hydraulic XY and Nitrogruppe is the structure-technical characteristic

It is already well-known that chicken embryos are used, in order to examine the toxicologischen characteristics from test substances to. Mostly the substance samples are supplied to the embryo for this purpose by way of the extraembryonale blood vessel system

35 two scientific publications from the recent literature are representatively of the common application of the chicken embryo more pharmakologischer as model system (Robert, W.G. and Hasan, T. CAN CERIUM RESEARCH, volume 52, 924 to 930.1992) or toxicological test rows (gold mountain, SJ, Dawson, B.V, Johnson, P.D, Hoyme, H.E. and Ulreich, PEDIATRIC RESEARCH, volume 32.23 to 26.1992) called

In the publication of Robert and Hasan become the pharmakologischen/pharmakotopologischen

40 characteristics of photo-dynamic Agentien in proliferating vascular and/or nonvaskulaeren fabrics of the chicken embryo described. The chicken embryo genesis serves as model system for the Angiogenese in solid tumors.

The publication of gold mountain and coworkers describes against it the employment of the chicken embryo as method, the Teratogenizitaet of substances, in particular from dichlorethylen to examine. By those

45 aforementioned publications however neither one before-describes nor suggested to examine photo-toxic and/or photosensitive substances at the chicken embryo.

For the investigation of potentially photo-toxic and/or photosensitiven substances so far only one animal model or Zelsysteme is available.

With the animal model it concerns the "Draize test", which seizes the attraction reaction of the photo-toxic substances 50 at the rabbit eye its application not only under cost criteria, but in particular also under the criterion of the animal protection limited.

The existing cell systems, i.e. bacteria -, yeast and other Eukaryontenzellen, are also than models for photo toxicity unsatisfactory, because they can place the physiological basic conditions behind of the photo-toxic and/or photosensitiven substance behavior only insufficiently.

55 of the available invention the task is the basis to create a technically simply arranged

procedure for the test from potentially photo-toxic substances to on the one hand the physiological conditions at the skin considered and on the other hand also future legislative projects and ethical Anforde rungen been sufficient. This task is solved by the characteristics from requirement 1

The available invention concerns thus on the one hand a procedure for the determination of the photo toxicity and/

60 or photo sensitivity of materials or material mixtures, comprehensively the contacting of the chemical material or material mixture with the vertebrate animal embryo or fabrics or fabric components of a vertebrate animal embryo, whereby after contacting additionally a treatment with UV radiation takes place, as well as the following evaluation of the embryos -, fabric or cell pathology.

After after a preferential execution form available of the procedure before contacting eggs of the class Aves, i.e. birds, inkubiert, will be removed then, at a later time the embryonalen Gastrulation, a part of the protein by at least one opening from the egg and if necessary a further inkubation been made and a further opening from the upper range of the Eischale for Irradiation is intended.

Although in principle any vertebrate animal embryo or a fabric or a fabric component of a vertebrate animal embryo can be used, it proved for practical reasons as meaningful, preferably inkubierte eggs of the class Aves, thus birds, to begin. The appropriate eggs of Straussen, Nandus, Emus, Kiwis, Steisshuehner, chicken birds, Hoazinen, combat quails, pigeons, flight chickens, Rallen, sheet chicken, Kranichen, Trappen, sea gulls, Watt birds, alkene, sea-divers, rag rope s are exemplarily here mentioned chern, penguins, storm birds, duck-like goose birds, Ruderfuesslern, walking birds, flamingo, day robbery birds, kuckucken, Turakus, parrots, Racken, eisvoegeln, bienenfressern, Widehopfen, wet horn birds, owls, Ziegenmelkern, Seglern, Kolibries, mouse birds, Trogons, Pfefferfressern, beard birds, honey indicators, woodpeckers and sparrow birds. It is particularly preferential, as if bird eggs of eggs of the kind Galliformes, i.e. chicken birds inkubierte, to begin under what in particular eggs of the species Gallus and/or also truthaehne or Puter ton fall.

The duration of the inkubation depends usually on the development time of the respective embryo.

After a preferential Ausiuehrun orm the available invention becomes after the first Inkubierung of the eggs the egg also with at least one provide ung. This opening is preferably in such a way out-arranged that it exhibits at least one size that by the opening a part of the protein can be removed. This 15 preferably it happens in the kind that by means of a suction apparatus, preferably for a pipette, as for example a Eppendorf pipette, a part of the protein, preferably 5 to 10 ml of the existing protein, is removed.

Following the exhaust a further opening takes place in the upper range of the egg shell, in order to be able to accomplish irradiation later. This happens generally in the way that with the help of a mechanical device a further now larger opening is inserted into the egg shell, which can take place for example by means of a sharp cutting or milling device. Following the mounting of the further opening within the upper range of the Eschale this opening is again locked and the E back in the Inkubator is given. For locking the opening one uses a usual catch means, whereby it is preferential to use for example a foil from a metal-containing or from organic materials as a containing material. Exemplarily here foils from plastic, aluminum or sandwich foils mentioned, just like appropriate wax plugs are. Thereupon if necessary again a inkubation is accomplished.

Following this inkubation on the fourth day of the Bebruetung the substances which can be tested are preferably applied, whereby it can concern with these chemical material/material mixtures biologically active so substances, for example Kosmetika, pharmaceuticals, herbicides or insecticides. Are can it with this chemical material EN/MATERIAL mixtures also light protection materials for technical products as well as for cosmetic and pharmaceutical compositions concern, which under the name UV filter admits is.

The treatment of the embryo or fabrics or as Gewebsbestandteilen of this embryo treated with the chemical material or material mixture takes place usually with electromagnetic irradiation within the range of 1 mm to 200 Nm, under what one normally the range of the infrared radiation, which radiation of the visible light and the UV radiation understands.

Preferentially it is however that the treatment with a UV radiation of a wavelength takes place smaller than 400 Nm, in particular with wavelengths between 250 and 400 Nm, i.e. mostly with a UV A radiation of one a wavelength between 315 and 400 Nm, alternative a UV b radiation of a wavelength of 280 to 315 Nm.

After a further preferential execution form the before-described treatment with the electromagnetic radiation takes place in the infrared range in actually well-known kind with infrared emitters, just as one can stop corresponding wavelengths in the visible range over color filters or a prism. For the range the UV radiation exists numerous radiation sources, as for example to mercury steam jet, Xe 45 non Hoechstdruckstrahler, sodium-vapor lamps, hydrogen and/or deuterium lamps as well as low pressure discharge tubes with noble gas fillings. Beyond that as UV emitters also wolframlampen and/or halogen bulbs assigned just like appropriate lasers.

If UV emitters are used, usually an irradiancy is inserted of 1 mJ/cm<sup>2</sup> to 100 J/cm<sup>2</sup>, the upper value corresponds to the maximum UV b dose, the lower value of the minimum in such a way UV A dose. The use of 5 to 10 J/cm<sup>2</sup> UVA is preferential, in particular 5 J/cm<sup>2</sup>.

Also the contacting according to invention of the chemical material with the fabrics or fabric components, preferably the chorionallantoischen diaphragm, in particular the Dottersackgefassmembran, the embryo effected either immediately or this contacting can amount to up to 24 hours.

After a preferential execution form the evaluation takes place macro and/or microscopic 55 Embryonalpathologie again either immediately or within one period up to 24 hours, preferably however after 5 min up to 24 hours. In the context of the aforementioned evaluation macro and/or microscopic Embryonalpathologie either the death of the embryo, the Haemorrhagie, which examines diaphragm discoloration or the fabric and/or tent pathology, becomes. The available invention is the basis further the task, a vertebrate animal embryo, to use a fabric in such a way or a fabric component of such an embryo to the Bestien mung the photo toxicity and/or photo sensitivity of chemical material/photo mixtures.

The available invention is more near described in the following by remark examples. Here %-data refer in each case to Gew: ss6.

For the execution of the procedure according to invention two connections with well-known photo-toxic characteristics were used, the 8-Methoxysoralen and the Hematoporphyrin. To judge the Promethazin and as the Ciprofloxazin assigned around the photo-toxic characteristics by means of the procedure according to invention.

First for this a non-toxic concentration of the aforementioned substances and one did not have toxi

sche dose UVA radiation to be experimentally defined. To that extent the procedure according to invention is accomplished similarly as the Huehneretest and serves for the determination of the non-toxic effect dose of a test substance in a preliminary test was found out that a UVA radiation of  $5 \text{ J/cm}^2$  does not exercise a macro of skopischen pathological effects on the Eidottersack with the procedure according to invention became a 10fach lighter concentration assigned to use around a non-toxic effect dose of the test substance at the Eidottersack and exclude toxic reactions surely. Only in a case, i.e. in presence of Ciprofloxazin, a non-toxic concentration was used, which was used clinically for intravenous injections.

The second stage of the procedure according to invention is an evaluation in the sense 2 x 2 factorial test Design with the factors irradiation "and" substance application "and the stages" "and" no "as evident from the following overview.

Substance application (not toxic concentration)

	yes	no
--	-----	----

t5

Be- strah20	yes	n, -12	n <sub>2</sub> , -12
	no	n <sub>3</sub> , -12	n4, -12

lung Within one duration of 24 hours the following parameters were evaluated the death of the embryo, those

25 halfquantitative diaphragm discoloration and the Haemorrhagie. This was accomplished as follows. Fertilized ones white long horn eggs (the sort Shaver star CROSS 28Å, Lohmann animal breeding GmbH, Cuxhaven, Germany) were inkubiert in a horizontal position in a usual Inkubator with 37,5° C and 65% of relative air humidity. After a 3-taegigen inkubation all eggs were analyzed, in order to out-assign such, which were defective. Without hurting the diaphragm bowl, a hole was bored into the bowl, by the 5 ml protein  
 30 was taken off, in order to degrade the embryo and him coating Eidottersack. Thereupon 1.5 x 2.5 cm a large window from the Eischale was out-sawed. The eggs were covered with one according to largely formed piece of wax and given back in the Inkubator. On day 4 of the inkubation only such eggs with normally developed embryos and blood vessel systems were used to the test

The following test substances were appliziert: 8-Methoxypsonalen (8-mop)  $10^3$  molecular in more physiological saline solution, Hematoporphyrin  $10^5$  molecular likewise in physiological saline solution (0,9%-ige sodium chlorid solution), Promethazin  $10^3$  molecular in physiological saline solution and Ciprofloxazin  $6.035 \times 10^3$  molecular in physiological saline solution. For each test substance that was used 2 x 2 factorial test Design. Each time to a sample by 12 eggs 500 pl the test substance by means of a Eppendorf pipette one appliziert and thereupon with  $5 \text{ J/cm}^2$  UVA emitters (320-420 Nm, Philips's tl 09/40W, Hamburg, German  
 40) illuminated in each case 12 eggs served as comparison without substance, to those 500 ID physiological saline solution found and/or. 500 was suspended in physiological saline solution in connection with  $5 \text{ J/cm}^2$  UVA irradiation. An evaluation took place immediately after it as well as 5,15, 30 and 45 min and/or. 1, 2, 4, 6, 8, 10 and up to 24 hours after the irradiation. During this time the death of the embryos was determined and halfquantitatively on the basis a 4-Punkt-Skala the diaphragm discoloration and the Haemorrhagie

45 Here the following classification was used:

Stage 0: no visible diaphragm discoloration / Haemorrhagie

Stage 1(licht): straight visible diaphragm discoloration / Haemorrhagie

Stage 2 (means): visible diaphragm discoloration / Haemorrhagie, structures is partly blurred to stage 3

(heavily): visible diaphragm discolorations / Haemorrhagie, structures are completely blurred.

50 the aforementioned changes by means of a Makroskops type M 420 of the company Leitz measuring technique GmbH, Wetzlar, to be able to analyze Germany noted around the consequences statistically not parametric tests used for the diaphragm discoloration parameters and the Haemorrhagie the contingency table test for special classes (a version of the Kruskal Wallis of test, modifies for arranged categories) begun the death rates became by means of Fisher the contingency table test analyzed therefore became for  
 55 each connection three statistic tests computes. With consideration of the number of tests and around the increased probability to find a significant result to compensate the A-level was adapted ( $A^*$ ). Therefore each of the three single tests was accomplished at a significance value of  $A^* = 0,0513$ , i.e. 0.0167.

RESULTS Hematoporphyrin

With Hematoporphyrin (HP) considerable morphologic changes with a maximum after 12 hours observed after 24 hours showed

75,0% (n-9) the Eidottersaecke a heavy discoloration of the diaphragm,

16,7% (n - 2) a middle and

8,3% (n-1) an easy discoloration of the diaphragm with substances, both with HP as well as UVA radiation

treated were. In contrast to it the check measurements showed only easy or middle diaphragm discolorations (with exclusive employment of HP

33,3% (n=4) easy and

25,0% (n=3) middle diaphragm discolorations; at the control's group, only with physiological saline solution and UV-A treated is

25,0% (n=3) middle diaphragm discolorations; and finally at only the group of comparisons treated with physiological saline solution were

50,0% (n = 6) easily and

16,7% (n=2) of the diaphragms moderately discolour). The contingency table test for arranged classes showed ~~ton~~ a significant result ( $p < 0.00004$ ).

After 24 hours showed

50,0% (n=6) the Eidottersaecke (Dottersackgefassmembranen) a middle and 50,0% (n=6) an easy Haemorrhagie, with both with HP as well as UV-A treated group. In

contrast to it the comparison samples only Haemorrhagie (HP showed an easy 16,7% (n=2) of an easy Haemorrhagie). The contingency table test for arranged classes showed a significant result ( $p < 0.00001$ ).

It was found further that in

#### 8-Methoxypsonalen

25

The substantial morphologic changes were tet after a maximum by 12 hours beobach. After 24 hours showed

16,7% (n = 2) the Eidottersaecke heavy,  
75,0% (n = 9) middle and

The comparison samples showed only easy ones to middle diaphragm discolorations (MOP 58,3% (n=7) easy and

33,3% (n=4) middle diaphragm discolorations; at the group, with physiological saline solution and UVA became with

41,7% (n = 5) easy diaphragm discoloration and

16,7% (n=2) middle diaphragm discoloration). The Kontingenztafeltest for arranged classes showed a significant result ( $p < 0.00002$ ).

91,7% (n=11) der Eidottersaecke a heavy and

8,3% (n=1) of a middle Haemorrhagie with the 8-MOP/UVA-Gruppe. The comparison samples showed an only easy Haemorrhagie (8-mop

16,7% (n = 2) easy Haemorrhagie; at the group, which acted with physiological saline solution and UVA 4 5 is

8,3% (n = 1) easy Haemorrhagie; at only the group treated with physiological saline solution 8,3% (n = 1) easy Haemorrhagie). The contingency table test for arranged classes showed a significant result ( $p < 0.00000$ ).

For the 8-MOP/UVA-Gruppe a lethality of the embryos of 100% (n = 12) determined in contrast in such a way in addition with the comparison samples never a death of the embryos determined Fisher's contingency table test showed a significant result ( $p < 0.00000$ ).

#### Promethazin

An important damage of the Dottersackgefassmembran with a point 12 hours after the irradiation only regarding Promethazin (PMZ) to combination with UVA radiation determined roof 24 hours pointed

66,7% (n=8) the Eidottersaecke a heavy,

8,3% (n = 1) a middle and

The inspection samples showed only an easy or middle diaphragm discoloration (PMZ

50,0% (n = 6) easy diaphragm discoloration; the Grup treated with physiological saline solution and UVA

PE

58,3% (n = 7) easy diaphragm discolorations; and exclusively with physiological saline solution the behan 6 5 delte group showed

58,3% (n=7) easy diaphragm discolorations and  
8,3% (n=1) middle diaphragm discolorations). The contingency table test for arranged classes showed a signifi

edge result ( $p < 0.00005$ ).

After 24 hours one found

41,7% (n = 5) the Dottersackgefaessmembran a heavy,

41,7% (n = 5) a middle and

5 8,3% (n=1) an easy Haemorrhagie, in the PMZ/UBA group. The control attempts showed only an easy Haemorrhagie (PMZ)

8,3% (n = 1) easy Haemorrhagie; during finite, a physiological saline solution and UVA irradiation

8,3% (n=1) of an easy Haemorrhagie; and during physiological saline solution

10 8,3% (n=1) of an easy Haemorrhagie). The contingency table test for arranged categories showed a significant result ( $p < 0.00000$ ).

After 24 hour goods

15 100% of the embryos in the PMZ/UVA group died. One found only two dead embryos in the groups of comparisons (at the group with physiological saline solution and UVA

8,3% (n=1) as well as during physiological saline solution

8,3% (n = 1)). Fisher's contingency table test showed a significant result ( $p < 0.00000$ ).

20

### Ciprofloxacin

An important damage of the Dottersackgefaessmembran was found only with a combination of Ciprofloxacin (CF) with UVA. After 24 hours were

25 91,7% (n = 11) the Dottersackgefaessmembranen heavily and

8,3% (n=1) of the diaphragms moderately in the CF/UVa group discoloured opposite that showed the comparison samples easy and middle diaphragm discolorations (CF

75,0% (n = 9) easy diaphragm discolorations and

30 25,0% (m=3) middle diaphragm discolorations; at the group, which was treated with physiological saline solution and UVA; one found

66,7% (n=8) easy diaphragm discoloration and

35 8,3% (n = 1) middle diaphragm discoloration. With with physiological saline solution one found easy diaphragm discolorations exclusive to 58,3% (n-7) and

8,3% (n=1) middle diaphragm discolorations; the contingency table test for arranged classes showed a significant result ( $p < 0.00000$ ).

After 24 hours showed

40 50,0% (n=6) the Dottersackgefaessmembranen an easy Haemorrhagie and

16,7% (n=2) a middle Haemorrhagie in the CF/UVa group. The comparison samples showed only an easy Haemorrhagie (CF

41,7% (n=5) easy Haemorrhagie. In the group treated with physiological saline solution and UVA one found

25,0% (n=3) easy Haemorrhagie and in exclusively with physiological saline solution treated the group

33,3% (n=4) easy Haemorrhagie). These groups did not differ clearly among themselves. None of the embryos died in any of the groups.

### Patent claims

45

1. Procedure for the determination of the photo toxicity, and/or photo sensitivity of materials or material mixtures, comprehensively the contacting of the chemical material or material mixture with a vertebrate animal embryo or fabrics or fabric components of a vertebrate animal embryo, whereby after contacting additionally a treatment with an electromagnetic radiation within the range of 1 mm to 200 to

50 the following evaluation of the embryos as well as takes place -, fabric or cell pathology.

2. Procedures according to requirement 1, thereby marked that before contacting eggs of the class Aves are inkubiert it is taken place, to a later time after the embryonalen guest relation a part of the protein over at least one opening removed from the egg ,if necessary a further inkubation and finally a further opening from the upper range the laeschale for the exposure is planned.

55 3. Procedure according to requirement by the fact 1 characterized that the chemical Stoffe/Stoffgem. biologically active substances, in particular pharmaceuticals, herbicides or insecticides cover or light protection materials for technical or biologically active substances are.

4. Procedure after one of the managing requirements, by the fact characterized that the treatment with a UV radiation of a wavelength < 400 Nm, preferably within the range between 400 Nm and 250 Nm ~~so~~ takes place

5. Procedure after one of the managing requirements, by the fact characterized that the UV radiation with an irradiancy of 1 mJ/cm<sup>2</sup> to 100 J/cm<sup>2</sup>, preferably 1 to 20 J/cm<sup>2</sup> UVA, in particular 5 to 10 J/cm<sup>2</sup> UVA takes place

6. Procedure after one of the managing requirements, by the fact characterized that contacting of the

~~65~~ Material mixture for a time of 10 seconds until 24 hours with fabrics or fabric components, advantages

point the Dottersackgefaessmembran or to the chorionallantoischen diaphragm of the embryo effected

7. Procedure after one of the managing requirements, by the fact characterized that the evaluation macro and/or microscopic Embryonalpathologie within a time of up to 24 hours, ~~pre~~

zugsweise between 5 min until 12 hours takes place.

8. Procedure after one of the managing requirements, by the fact characterized that the death of the embryo, the Haemorrhagie, diaphragm discoloration or the fabric and/or the tent pathology are judged.

9. Procedure according to requirement 2, by the fact characterized that eggs of the kind Galliformes are used in particular however eggs of the kind Gallus or truthahn.

10. Use of a vertebrate animal embryo or fabrics or fabric components of such Embry OS for the determination of the photo toxicity, and/or photo sensitivity of chemical material EN/MATERIAL mixtures.